

PCT/DE 00/01944

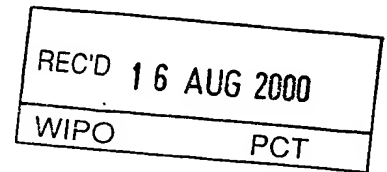
BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

DE 00/1944

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



4



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Gebrauchsmusteranmeldung

Aktenzeichen: 200 07 494.6

Anmeldetag: 26. April 2000

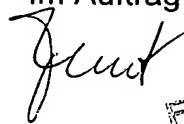
Anmelder/Inhaber: Thomas Roitsch, Regensburg/DE

Bezeichnung: Promotorsystem, dessen Herstellung und Verwendung

IPC: C 07 H, C 12 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Gebrauchsmusteranmeldung.

München, den 18. Juli 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag


Faust

3

nöch andere Regionen oberhalb des Transkriptionsstartpunktes identifiziert, die die Häufigkeit der Transkriptionsinitiation in Eukaryonten beeinflussen. Diese DNA-Bereiche, die Enhancer genannt werden, beeinflussen die Aktivität von Promotoren in ihrer Nachbarschaft. Diese Sequenzen sind jedoch der Definition nach keine Promotoren, da ihre Position nicht fixiert sein muß.

Um ein fremdes Gen in einem Organismus, z.B. einer Pflanze, exprimieren zu können, muß die kodierende Sequenz dieses Genes unter die Kontrolle eines Promotors gestellt werden und in die Pflanze eingebracht werden. Zur Insertion des zu exprimierenden Gens in das Pflanzengenom wird die fremde DNA meistens in das Ti-Plasmid von *Agrobacterium tumefaciens* gebracht, und dieses wird dann verwendet um die Pflanzen zu transformieren. Eine zweite häufig verwendete Methode ist die direkte Transformation von DNA z.B. mit Hilfe der sogenannten "particle gun". In den meisten Fällen werden hierfür bisher aus Bakterien isolierte Promotoren oder Promotoren von Pflanzenviren verwendet, die zur Expression des fremden Genes in den Pflanzen führen. Diese Promotoren haben den Nachteil, daß sie artfremd sind und daher den Kontrollmechanismen innerhalb der Pflanzen nicht unterliegen.

Bei Verwendung eines pflanzlichen Promotors ist die Expression eines fremden Genes möglich, die somit auch den pflanzlichen Kontrollmechanismen unterliegt. Durch Untersuchungen der Expression des Gens, vor dem der Promotor ursprünglich liegt, lassen sich genaue Kenntnisse über die Expressionsstärke, die Zeit, zu der das Gen exprimiert wird, und den Expressionort sammeln, die auf die Expression eines fremden Genes, das unter die Kontrolle dieses Promotors gestellt wird, weitgehend übertragbar sind. Ein weiterer Vorteil ist, daß bei Verwendung eines genau charakterisierten, pflanzlichen Promotors gezielte Eingriffe und Untersuchungen in die Entwicklung bestimmter Pflanzenteile möglich ist.

Im vorliegenden Fall wurde der Promotor einer Invertase aus Tabak kloniert, die in sehr großen Mengen, aber nur in einem bestimmten Entwicklungsstadium und hochspezifisch, nur in den Antheren exprimiert wird. Zur Klonierung des Promotors wurde eine genomische Bank aus Tabak mit einer Sonde aus dem kodierenden Bereich der untersuchten Invertase durchsucht. Die erhaltenen genomischen DNA-Sequenzen wurden mit molekularbiologischen Methoden weiter charakterisiert und schließlich ein Klon isoliert, der die Promotorsequenz enthielt, die dann sequenziert wurde. Es wurden Expressionskassetten mit verschiedenen Genen hergestellt, die in *Agrobacterium tumefaciens* eingebracht wurden, um Tabakpflanzen damit zu transformieren. Dieses neue Promotorsystem kann nun dazu verwendet werden, fremde Gene in Pflanzen in

4

einem bestimmten räumlichen und zeitlichen Rahmen zu exprimieren. Das Wort fremd meint dabei Gene, die nicht natürlich in Verbindung mit diesem Promotor-vorkommen. Außerdem kann mit Hilfe dieses Promotorsystems die Expression von fremden und eigenen Genen in der Pflanze moduliert werden, d.h. Gene können überexprimiert oder reprimiert werden.

5

Ausführungsbeispiele:

1. Die Promotor-DNA-Sequenz, bestehend aus den 4300bp des 5' liegenden DNA-Bereiches, gezählt oberhalb vom Translationsstartpunkt der antherenspezifisch exprimierten Invertase aus Tabak, oder Teile davon, die dadurch gekennzeichnet sind, antherenspezifische Expression für dahinter gelegene Gene zu vermitteln, kann mit Hilfe molekularbiologischer Methoden so verändert werden, daß Restriktionsschnittstellen am 5'- oder 3'-Ende eingefügt werden.
2. Die wie in 1. veränderte Promotor-DNA-Sequenz oder Teile der Promotor-DNA-Sequenz können zur Herstellung einer Expressionskassette zur Expression fremder Gene in Pflanzen verwendet werden. So eine Expressionskassette ist dadurch gekennzeichnet, daß sie a) die Promotor DNA oder Teile davon aus 1. enthält; b) eine Verbindungs-DNA ohne spezielle Funktion bzw. fremde Gene, verbunden mit der ersten Schnittstelle beinhaltet; und c) eine 3'-Region, bestehend aus der 3'-Region eines eukaryontischen Genes enthält, wobei diese 3'-Region eine zweite Restriktionsschnittstelle an ihrem 5'-Ende besitzt und diese 3'-Region über diese zweite Restriktionsschnittstelle mit der Verbindungs-DNA bzw. den fremden Genen aus b) verbunden ist.
3. Eine Expressionskassette wie in 2. beschrieben, kann in einen Expressionsvektor kloniert werden. Dieser Expressionsvektor kann dazu verwendet werden, mit Hilfe verschiedener gängiger Methoden (z.B. Agrobakterien vermittelte Transformation; direkte Transformation) Pflanzen zu transformieren. Transgene Pflanzen können dann unter Bedingungen angezogen werden, unter denen das fremde Gen unter der transkriptionellen Kontrolle der beschriebenen Promotor-DNA-Sequenz exprimiert wird.
4. Die Promotor-DNA oder Teile davon können dazu verwendet werden, die Translation eines pflanzeigenen Genes zu modulieren. So kann die Expression eines Genes durch Einbringen weiterer Kopien unter der Kontrolle dieses Promotors gesteigert werden oder die Expression kann mit Hilfe der Antisense-Technik unterdrückt werden. Dazu muß die DNA-Sequenz des zu unterdrückenden Genes in "verkehrter Richtung" in eine Expressionskassette wie unter 2. beschrieben kloniert werden und wie unter 3. beschrieben in Pflanzen transformiert werden.
5. Die spezifischen Eigenschaften der Promotor-DNA-Sequenz bzw. von Teilen davon, ermöglichen in transgenen Pflanzen, die wie unter 3. beschrieben hergestellt wurden, eine

6

zeitlich (nur während der Pollenbildung) und räumlich (nur in Antheren) definierte Expression von fremden Genen in Pflanzen.

6. Aufgrund des starken Expressionslevels der antherenspezifischen Invertase in Tabak, lassen sich mit Hilfe dieser Promotor-DNA-Sequenz bzw. mit Teilen davon, in transgenen Pflanzen große Mengen eines bestimmten Proteins zu einem bestimmten Zeitpunkt und in einem bestimmten Ort der Pflanze (siehe 5.) herstellen. Dieses Protein kann dann durch Ernten der Antheren, Aufschluß und für das hergestellte Protein spezifische Reinigungsverfahren in großen Mengen gewonnen werden.

7. Die Promotor-DNA-Sequenz, oder Teile davon, können dazu verwendet werden, in die Entwicklung der Antheren in Pflanzen einzugreifen. So können transgene Pflanzen hergestellt werden, bei denen beispielsweise durch Antisense-Expression von Invertase-Sequenzen die Proteinmengen für die extrazelluläre Invertase verringert werden. Dies führt zu männlich sterilen Pflanzen, die in der Landwirtschaft, bei der Herstellung von Hybridsaatgut von großer Bedeutung sind.

8. Die Verwendung des Promotorsystems zur Herstellung männlich steriler Pflanzen, wie z.B. unter 7.-beschrieben kann als Sicherheitssystem bei der Herstellung anderer, kommerziell oder wissenschaftlich nutzbarer transgener Pflanzen verwendet werden. So besteht bei Verwendung männlich steriler Pflanzen nicht die Gefahr des Auskreuzens der genetischen Veränderungen auf Pflanzen die auf benachbarten Feldern oder wild wachsen. Die begrenzte Natur des Eingriffes der zur männlichen Sterilität bei Verwendung dieses Promotorsystems führt stellt einen besonderen Vorteil dar, da nicht in das vegetative Wachstum der Pflanze eingegriffen wird und keine Wechselwirkungen mit den zusätzlich eingebrachten genetischen Veränderungen zu erwarten sind.

9. Die Promotor-DNA-Sequenz, oder Teile davon, können dazu verwendet werden, transgene Pflanzen herzustellen, die pflanzeigene Stoffe in großer Menge herstellen, die positiv auf ihre Entwicklung, insbesondere betreffend den Ertrag von fruchttragenden Pflanzen, wirken können. Beispiele für solche pflanzeigene Stoffe wären Wachstumshormone oder Proteine die zur Energieversorgung der wachsenden Gewebe (z.B. Invertasen, Zuckertransporter) notwendig sind.

7

10. Mit Hilfe des Promotorsystems können transgene Pflanzen hergestellt werden, in denen die Menge der produzierten pflanzeigene Stoffe (z.B. Wachstumshormone) reduziert werden kann. Diese Reduktion kann durch Einbringen von abbauenden Enzymen, von Inhibitoren oder durch sog. "single-chain" Antikörper erreicht werden.

11. Um Erträge von männlich sterilen, fruchttragenden Pflanzen zu erhalten und zur Vermehrung männlich steriler Pflanzen, die unter Verwendung des Promotorsystems wie z.B. unter 7. beschrieben hergestellt wurden können Restorerstämme hergestellt werden, die nach einer Kreuzung mit den männlich sterilen Stämmen zu fertilen Pflanzen in der F1-Generation führen. Restorerstämme für die unter 7. beschriebenen männlich sterilen Pflanzen könnten Proteine enthalten, die die Kohlenhydratversorgung der Antheren wieder herstellen können, wie z.B. artfremde Invertasen (z.B. aus *Saccharomyces cerevisiae* oder Bakterien), oder Saccharosetransporter in Verbindung mit intrazellulären saccharospaltenden Enzymen (z.B. Saccharose Synthase, neutrale oder vakuoläre Invertasen).

12. Alternativ zur Herstellung von Restorerstämmen wie unter 11. könnten Pollen von männlich sterilen Pflanzen in einer in vitro Kultivierung zu fertilen Pollen entwickelt werden, mit denen dann eine Befruchtung der transgenen Pflanzen stattfinden kann.

13. Pollen können durch eine in vitro Embryogenese zu haploiden Pflanzen herangezogen werden. Diese haploiden Pflanzen können dann zu homozygoten diploiden Pflanzen gezüchtet werden. Zur Induktion dieser in vitro Embryogenese ist ein Hunger- und Stress-Schritt nötig. Da transgene Pflanzen, die unter Verwendung des Promotorsystems wie z.B. unter 7. beschrieben hergestellt wurden, in ihrer Zuckerversorgung gestört sind, sind die Pollen dieser Pflanzen bereits in Richtung Embryogenese determiniert und es bedarf keiner zusätzlichen Hunger- oder Stress Behandlung mehr. Die Embryogenese läuft in diesen Pflanzen daher schneller und effizienter ab.

Erreichte Vorteile:

Mit Verwendung dieses Promotorsystems steht ein Werkzeug zur Verfügung, mit dem man zeitlich und örtlich gezielt fremde Proteine in Pflanzen exprimieren kann und pflanzeigene Gene in ihrem Expressionslevel modulieren kann.

Ansprüche

1. Promotorsystem, gekennzeichnet durch einen Klon aus genomischen DNA-Sequenzen.
2. Promotorsystem, gekennzeichnet durch Expressionskassetten.
3. Verwendung eines Promotorsystems nach Anspruch 1 oder 2 zum Beeinflussen eines Genes.
4. Verfahren zur Herstellung eines Promotorsystems nach Anspruch 1 oder 2.
5. Verfahren zum Experimentieren mit einem Promotorsystem nach Anspruch 1 oder 2.

Zeichnung 1: Promotor-DNA-Sequenz der extrazellulären Invertase aus Tabak

```

1  TCTAGAAATGA CGCCACCGGC CAGGACGGGG AGTATGATTT CCCCGAATGT
51  TCGTTCAACT GCATTGTTAA AACCTGTTAG CGTGATGCAG CCCGGTACTA
101 TCTTATCCTC GAGTTTCATT TGTGCAAGTA CTCGAGGATG GACAATTCAC
151 GGGCCACTCC CATCGTCCAC CATAATGCGT CTTACATCTG TATCTAATAT
201 TCGTAAAGTG ATAACGAGGG CATCATAGTG AGGGAAAACC AAACCGTGGT
251 TATCTGACTT ATCGAAGATG ATACTTTCTT TAAGTTTCTC GTACCGTTCA
301 TGAGTGATTA ACTGTTTGAG CTTGTGGGTT GTGGCGAACT TTACGTTGTT
351 GATCGAAACG TCGTCTCCGC CCCCATGAT AATGTGAATG GTGCGAGTCG
401 GTAAGGGTGG TTTCCGGCGT CCTCGGTGTT GTTCACGTCC TCGAGAAAAG
451 TTGGTCCCTC CTCGGTCACA CAACATATTT TTGAGGTGTC CTTTGTGAAG
501 CATGTCATG ACCCTCTGTC TTAGGCGGAT ACAATCCTCA GTTTTCTGAC
551 CTCGCTCTTG GTGGAACCTG CAGAGGGCAT CTGATTTTCT AGTGCTTGGA
601 TCTGACCTCA TCTTTTGTGG CCACTTTACT TTTGGTCCGA GCTTCTTCAA
651 TGCATAGACT ATTTCTGAGG GTGACACACA AAATTTGTGA GCGGATAGTA
701 AAGAGGGCAT ACCTCTCTCG TTCCGGTGAG TCCCTGTCCT TGGCCTAGAT
751 GGGCCCTCTT CGTAGCGGGA GAGGGGCATG ATGGCACTTT TGACATATGG
801 TTGATCCATT TCTCGGTTAG ATCATGGAGC TGCAAGATCT CTCTTGGCAT
851 CATTTTGACG ATCCTTCCTG GTTTCGGCTT GTACCGAGGT CAATCGATGA
901 GTTGGCCGAT TCAGGTCGTC TTCGTCGGCA CGGGCCTCAG CACAGTAGGC
951 GTTGTGTATT TCATCCCAAG TGGTTGGAAG ATATTTCTAT AGTTGGTTTA
1001 ACAGTTTTCT GGTGCGCCCTC GAGCCATTCA TGTTGAGCCC ATTCTGGAAG
1051 GTTGCTACAA CCATTCCTTC TGATACATTC GGTAAGGTCA TCCTTACTCT
1101 GTTGAATCGA GCGAGGAAGT CCGTCAATCC CTCTCCGAGT GATTGTTTGA
1151 TGGCAAATAT ATCGTTCACT CTTGCTCCG CGTTTTTAGC CCCAACATGG
1201 GCCATTATGA ACTTGTCGGC CATCTCTTCG AATATTTCAA TGGAGCGCGC
1251 GGGCAGCTGT GAATACCAAG TCAATGCTCC TCCGGTAAGG GTCTCGCCGA
1301 ACATTTTCAA CAAGATGGAG GAGACTTGTT CTTTGGAGAG ATCATTGCCC
1351 TTTACCGCAG TGACATAATG ATTACATGAT CTTCCGGGTC GGTCTGACCA
1401 TCATAAATTT TCAGATAAGG TGGCATCTTG AACGTCTTGG GTATGGCATA
1451 TGGGGCGGCT TCATCACTGT AGGGTTGCTC GACTAACCGA CCAGCGTCTC
1501 TTTTGGAAA TATTTTGGG GCACCCGGTA TTTTATCGAC TCTTCTTGG
1551 TGTTCTCTCA TTTGATCCCG AAGCATTTTA TTTTCGTTTT CATTCTCTC
1601 CATTTTCTTC AGAATGGCCG TGAGGGTGTC ATTACCTGCA TTATTAATAT
1651 TGTGAGTGAT ACCTGTTACT GAAGGGGGAG GGTGCTGCTG TTTGGTCATT
1701 GCTGGTGCAA TGCAAGTCCT TGCATTTTCT CTAATACCT CCTGAGTGGG
1751 TTTGTTGAGG ATGCGGTCAT GCATATTTGT CAGCCAAGCT TCGAGTAGCT
1801 TCTTCACCGC TGGTGGCGCC TCTTCCGTTG TGGACGTGGA AGCTCCTTTA
1851 CCGCGGGATG TTGCGATACT GCTGTGAGGG AGGGGTGATC CACTTCGTCG
1901 GGGAGAGGTG TTAGCGTTA TGCCTTCGCC TTCTATTTCT GAGACCTCAT
1951 TGATGGTGTG TAAGAGGTTG GTAGTGAGAT TGGCCACTGC CTTCTATCCTT
2001 TCTTCTCCCT TACCTGCCAT GTCAGATCTG GGTGTACAAG GAAGTAGGAG
2051 CTTCTCTCTT TCTTTTTTGT GAATGTGCTC AGTTATAGAT CTAAAAGAAA
2101 CTAAAGTTTT AACTAGACTA TCCTCACAGA CGGCGCCAAA TTGTTTGACC
2151 AAAAAATATA GACTTTTGAT TAAATTAATT AATATTGTAT GACAAAGGAT
2201 TAAACCTAGT TAATGATAAT AACTTCAGAT CTATAATCAA TTAACAGCAA
2251 TCACGGTCAT AGCAGCGTTG AGAGAAGATT AAATGTGATG TYCATTCAAT
2301 ATTTCAAGAT CATTAATGAT AGGGGAATAT CAAGCAATAA ATAACGATAA
2351 ATGGCATTAAG AGTAAATAAG GAGAATGATT CACCCAATAT TGAATGAGGT
2401 GGATGATTCT TCTTTTGTAC AATGATGAAT GATGGGCAAA TACTAGAATG
2451 TTGGGACCCT TCTCGGATCT AATGAAAAAA GTATGGAATA GTAGATAATC
2501 GAATCTCTTT AGAAAGGTAG TGATTGTCTT TTATCTAGAG AGAAAGTCTG

```

10

2551 CTTTTCAAAG AATATTTTTA TCAGAGAATA TTACATCCCC CTCTCTCCCT
 2601 ATCTCTTTT-CTATTTATAT GGGACATTC TCAATCAATC CTAAAAGTAC
 2651 ATACACCAAG AATATTCAAT AAAATATTTT TTTGAATATT CTATTATAAA
 2701 AACTAGCIGT TAGCACTCGA CCTCGGTCGY TATTGACTAC TCGGTTACGA
 2751 GCCCTGTCTT TACTAATCG ACCTCGATTA CATCACTTTC TACGATACTG
 2801 CTTTATGTCA AATCTTAATG AAAGCAGATT TTGACCCATA CAATAATATG
 2851 ACAAAATTGC TTCCAAAGAA AACATGGCTC TTATAGTGAA ATATCGTTAG
 2901 ACTGTATATG AAAGATCTGA ATTTATTTAT AAGAATAGTG TTTTCTCTT
 2951 TTCTTTTCAT ATCTAAGGAG TAAAGCAACC ATGAATAGAA AAGGCTTAGT
 3001 AACTATATAT CAAAGGAATG GTGTTTTTTC TTTAAATATG GATAAAAATT
 3051 TGTGAATATA GAAGATTAGA TCAATTAACA AAGGTTATGG TGGAGTGGTA
 3101 AGCAGAGGCG GACCTATGTG TTATAGTAAG GGGTCACCCA CTACTAGAAA
 3151 TCCGCTAAAG ATCGATCAA AAACCGACCA ACATTGGTTC GTAATGGCCA
 3201 AAAACTGACC AAACCGCGAT CATTTACGTG TGAACGGTAT TTTTATGGTC
 3251 GGAAAGGAAT ACCGACCAA GTTGGTCGGA AATTACCGAC CAACTTTGGT
 3301 CGGTCAATTA AATCAAAAA AAATATTGTA AAAAAAACC GACCAAAGTT
 3351 GATCGGTATT TTAATTATGT AATAAAAAGA TTCACTATCT GGGAAATCGAA
 3401 CCGGGGTCTC TACTATGGCA AGATACTATT CTACCACTAG ACCATTGGTT
 3451 CATTTTGTGT TAAGACTGTC TTTTATTTGA TTTATACTCT TTAATTATAT
 3501 TTTTGGACGA AATAAACCGA CCAAAGTTGG TCGATTTTAT TAAAAAGTAA
 3551 AATTACTTAC CAAAGTTGGT CGATTTTTTT AATTGATCCG CCGAATTAAC
 3601 CGACCAATTT TGGTAGGTTT TTTTAATATT AATTTTTATT TATTTTAATT
 3651 GAAAAACTAA CCAAAGTTAG TCGCTTTCTT GAAACATAAA TTTTCGCGGA
 3701 CTCAAAAATA GTTTCGCGCA TTTTTCGCGC AAAGAAAACC GACCAAAGTT
 3751 GGTGCGTTTC GTAAAAAAA AAAAAATTTA AAAAAATATAT TTTAAAAAAC
 3801 CGACCAACTT TAGTCGGTTT TTTGCTCGAT TTTTGAACCG ACCAAAGTTG
 3851 GTCGGTCGAC CTGCTCGGT TTTTCCCGAA TTTCTAGTAG TGACCGAACC
 3901 CTGTAAGCTT CGGAGAGAA TTTGTATATG TATATGTGTA TATCCTTAAA
 3951 ATGATTAAAT TAAAGAAGT GGCACCTGA ATACTAGAAG CTTTLAGGGG
 4001 CACTAGATGA GCAGAATAAC GTGTTCTCGT CGCGTAAAAA TACTTGGATC
 4051 CGCCTATGAT GGTAAGTACT TCTTCGTCTT TAATCAGAGG TTTTCGACTTC
 4101 GAGCTCCAGA TATAAACTAT AGACTCGTCT TTATAGCACC TTTTAATAAG
 4151 ACTATGACTT CATCTGATTT CTCTATAAAT ACTCCTCAAG CTTTCGGTTC
 4201 TTCTCCATIG TTCAGTTTCT TTCTCCACAT CACAGAAGTG AAAACAAAAC
 4251 AAGAAGAAGA AGAAGAAGAA AAATAAAGAG TTTCTGTCAA ATTAAGTCCA
 4301 ATAGGGAAAA TG